



(51) 国際特許分類6 C12N 15/84	A1	(11) 国際公開番号 <div style="border: 1px solid black; border-radius: 15px; padding: 2px; display: inline-block;">WO97/42334</div>  (43) 国際公開日 1997年11月13日(13.11.97)
(21) 国際出願番号 PCT/JP97/01569  (22) 国際出願日 1997年5月9日(09.05.97)  (30) 優先権データ 特願平8/115114                      1996年5月9日(09.05.96)      JP 特願平9/80821                      1997年3月31日(31.03.97)      JP  (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 日本製紙株式会社 (NIPPON PAPER INDUSTRIES CO., LTD.)[JP/JP] 〒114 東京都北区王子一丁目4番1号 Tokyo, (JP)  (72) 発明者; および  (75) 発明者/出願人 (米国についてののみ) 杉田耕一(SUGITA, Koichi)[JP/JP] 上杉幹子(UESUGI, Mikiko)[JP/JP] 松永悦子(MATSUNAGA, Etsuko)[JP/JP] 海老沼宏安(EBINUMA, Hiroyasu)[JP/JP] 〒114 東京都北区王子五丁目21番1号 日本製紙株式会社 中央研究所内 Tokyo, (JP)	(74) 代理人 弁理士 萩野 平, 外(HAGINO, Taira et al.) 〒107 東京都港区赤坂一丁目12番32号 アーク森ビル28階 栄光特許事務所 Tokyo, (JP)  (81) 指定国 AL, AU, BA, BB, BG, BR, CA, CN, CU, CZ, EE, GE, HU, IL, IS, KR, LC, LK, LR, LT, LV, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, SG, SI, SK, TR, TT, UA, US, UZ, VN, YU, ARIPO特許 (GH, KE, LS, MW, SD, SZ, UG), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BI, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).  添付公開書類 国際調査報告書	
(54)Title: VECTOR FOR GENE TRANSFER INTO PLANT ALLOWING OPTIONAL DELETION OF MARKER GENE  (54)発明の名称 マーカー遺伝子を必要に応じて除去できる植物への遺伝子導入用ベクター  (57) Abstract A vector for gene transfer into a plant allowing the deletion of a marker gene transferred into the plant together with the target gene, if necessary after the expression thereof, from the DNA of the chromosome, etc. wherein the marker gene exists and acts to thereby eliminate its function and to detect the expression or elimination of the function of the marker gene on the basis of morphological changes in the tissues originating in the plant cells into which the genes have been transferred. The vector is constructed by using a gene capable of inducing morphological abnormality as the marker gene and controlling a DNA factor capable of leaving with a regulator so that the morphological abnormality-inducing gene is located at such a position as to act together with the DNA factor but the target gene is not located at such a position as to act together therewith.		

# (57) 要約

目的遺伝子と共に植物細胞へ導入されたマーカー遺伝子を、その発現後に必要に応じて、これが存在し、機能する染色体等のDNAから除去してその機能を消失させることができ、しかもかかるマーカー遺伝子の機能の発現・消失を、その導入された植物細胞に由来する組織の形態変化により検出することができる、植物への遺伝子導入用ベクターを提供する。マーカー遺伝子として形態異常誘導遺伝子を用い、一方、脱離能を有するDNA因子を発現誘導型の調節因子の制御下において、形態異常誘導遺伝子がこの脱離能を有するDNA因子と挙動を一つにする位置に存在し、かつ、目的遺伝子がこれとは挙動を一つにするものない位置に存在するよう、ベクターを構築する。

## 参考情報

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に記載されたPCT加盟国を特定するために使用されるコード

AL	アルバニア	ES	スペイン	LR	リベリア	SG	シンガポール
AM	アルメニア	FI	フィンランド	LS	レソト	SI	スロヴェニア
AT	オーストリア	FR	フランス	LT	リトアニア	SK	スロヴァキア共和国
AU	オーストラリア	GA	ガボン	LU	ルクセンブルグ	SL	シエラレオネ
AZ	アゼルバイジャン	GB	英国	LV	ラトヴィア	SN	セネガル
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GE	グルジア	MC	モナコ	SZ	スワジランド
BB	バルバドス	GH	ガーナ	MD	モルドヴァ共和国	TD	チャード
BE	ベルギー	GM	ガンビア	MG	マダガスカル	TG	トーゴ
BF	ブルキナ・ファソ	GN	ギニア	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア共和国	TJ	タジキスタン
BG	ブルガリア	GR	ギリシャ	ML	マリ	TM	トルクメニスタン
BJ	ベナン	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	TR	トルコ
BR	ブラジル	ID	インドネシア	MR	モーリタニア	TT	トリニダード・トバゴ
BY	ベラルーシ	IE	アイルランド	MX	メキシコ	UA	ウクライナ
CA	カナダ	IL	イスラエル	MW	マラウイ	UG	ウガンダ
CF	中央アフリカ共和国	IS	アイスランド	NE	ニジェール	US	米国
CG	コンゴ	IT	イタリア	NL	オランダ	UZ	ウズベキスタン
CH	スイス	JP	日本	NO	ノルウェー	VN	ヴェトナム
CI	コート・ジボアール	KE	ケニア	NZ	ニュージーランド	YU	ユーゴスラビア
CM	カメルーン	KG	キルギスタン	PL	ポーランド	ZW	ジンバブエ
CN	中国	KR	朝鮮民主主義人民共和国	PT	ポルトガル		
CU	キューバ	KR	大韓民国	RO	ルーマニア		
CZ	チェコ共和国	KZ	カザフスタン	RU	ロシア連邦		
DE	ドイツ	LC	セントルシア	SD	スーダン		
DK	デンマーク	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン		
EE	エストニア	LK	スリランカ				

## 明 細 書

マーカー遺伝子を必要に応じて除去できる植物への遺伝子導入用ベクター

### 技 術 分 野

本発明は、遺伝子工学的手法により目的遺伝子を植物に導入して形質転換植物を得る際に有用な新規ベクターに関する。

### 従 来 技 術

遺伝子工学技術を利用した微生物、培養細胞などの形質転換は、現在、医薬品として有用な生理活性物質の生産等の目的に応用され、実産業においても多大の貢献をなしている。植物育種の分野においては、植物細胞のライフサイクルが微生物等に比較して長いこと等の理由から、遺伝子工学技術の実産業への応用はやや遅れているが、この技術は、目的とする遺伝子を直接、育種の対象となる植物に導入することを可能とするため、(a) 改変すべき形質のみが導入できる、(b) 植物以外の種(微生物等)の形質も植物に導入できる、(c) 育種期間の大幅な短縮ができるなど、交配を重ねて行う古典的な育種と比べて多くのメリットを有し、その応用は、植物育種の飛躍的進歩をもたらすものと期待され、またこの期待は現実のものとなりつつある。

具体的に、目的遺伝子を対象植物に導入し、遺伝子導入植物を作成するには(1) 目的遺伝子の植物細胞への導入(染色体、核等に導入される場合も含む。)、(2) 目的遺伝子が導入された細胞のみからなる植物組織の選抜、(3) 選抜された植物組織からの植物体の再生、の3段階を必ず経ることになる。また、このうち、目的遺伝子導入組織の選抜にあたっては通常、マーカー遺伝子を使用する。即ち、これを目的遺伝子と共に植物細胞へ導入し、その導入細胞、ひいてはこの細胞から生ずる組織がマーカー遺伝子の発現によって示す特徴的な性質を、目的遺伝子導入の指標として用いるのが普通である。従って、遺伝子工学的手法によって形質転換された植物は、現在のところ殆ど例外なく、目的遺伝子の他にマーカー遺伝子が導入され、発現している。

しかし、このようにマーカーとして使用される遺伝子の遺伝子産物に関しては、まだごく一部の遺伝子につき、人体への安全性が確認されたのみである。このため、たとえマーカー遺伝子を用い、有用な形質を導入したトマトやジャガイモが作出できたとしても、このマーカー遺伝子が発現している限り、これらを、例えば食用として供給することについては、消費者の漠然とした不安感によるものも含め、多くの障害が予想される。

さらに、遺伝子導入組織を選抜した後においては、マーカー遺伝子の発現は、植物育種を目的とする研究者のレベルにおいても、大きな障害を与える。すなわち、あるマーカー遺伝子を用いて作成された遺伝子導入植物に対して、さらに別の遺伝子を新たに導入しようとする場合には、二度と、同一のマーカー遺伝子を用いて遺伝子導入を行うことができない。すでに、対象となる植物には、このマーカー遺伝子が存在しているため、再びこれを、新たな目的遺伝子と共にその同じ植物に導入しても、新たな目的遺伝子が導入されようがされまいが、その植物においてはこのマーカー遺伝子が常に発現し、これを目的遺伝子導入の指標とすることは、もはやできないからである。従って、ある植物に対して遺伝子導入を繰り返すことができる数は、その植物に対して何種類の異なったマーカー遺伝子を使用できるかによって、自ずから制約を受けることとなる。しかし、現在実用できるマーカー遺伝子の種類はさして多くない。しかも、これらのマーカー遺伝子全てが、対象となる植物に使用できるわけではないのである。

これらの問題を解決し、マーカー遺伝子による影響から完全に解放された遺伝子導入組織・植物を効率良く作成するため、本発明者らは先に、目的遺伝子を植物細胞へ導入するための新規なベクターを開発した（特願平7-313432）。これは、目的遺伝子、マーカー遺伝子として形態異常誘導遺伝子、及び脱離能を有するDNA因子を含み、かつ、形態異常誘導遺伝子はこの脱離能を有するDNA因子と挙動を一つにする位置に存在し、また目的遺伝子はこの脱離能を有するDNA因子とは挙動を一つにすることがない位置に存在する、という構成を有するものであり、これを用いて植物細胞中へ遺伝子導入を行うと、目的遺伝子と共に導入されたマーカー遺伝子は、その発現後に一定の確率で、これが存在し、機能していたDNA上から脱離してその機能を失い、しかもそのマーカー遺伝子の

機能の発現も消失も、これが導入された植物細胞に由来する組織の形態変化として検出することができる。即ち、このマーカー遺伝子が発現している細胞から由来して形成された組織は、なにがしかの異常な形態を示し、また、その後かかる組織から、このマーカー遺伝子が脱離して機能を消失した細胞（換言すれば目的遺伝子のみが導入されている細胞）が生じた場合には、正常な形態をした組織が、この細胞に由来して再び出現するようになるのである。それ故このベクターは、目的遺伝子のみが導入されている細胞からなる植物組織、さらには植物体を、遺伝子導入細胞の培養と、培養して得られた組織の肉眼による選抜とを繰返すだけで得ることを可能とする。

しかし、本発明者らの開発したこのベクターにおいても、マーカー遺伝子の脱離を任意に制御することはできなかった。そのため、脱離能を有するDNA因子の能力が高い場合には、マーカー遺伝子が極めて速やかに脱離して、例えば、目的遺伝子と共に植物細胞へ導入した直後、その発現前にマーカー遺伝子が脱離してしまうことも起こり得たが、こうなると、目的遺伝子のみが導入されている細胞からなる組織が得られたとしても、マーカー遺伝子の働きによる遺伝子導入組織の形態変化は全く起こらず、結局、かかる組織を選抜することができなくなる。

また、マーカー遺伝子の脱離が任意に制御できたならば、目的遺伝子のみが導入されている細胞の発生、そしてかかる細胞からなる植物組織の発生を同期させたり、適宜調整することも可能となるので、実際にこのようなベクターを使用して遺伝子導入植物を作出等する上で、非常に便利となる。

従って本発明の目的は、マーカー遺伝子を有し、かつ、目的遺伝子と共に植物細胞へ導入されたこの遺伝子を、その発現後に必要に応じて、これが存在し、機能する染色体等のDNAから除去してその機能を消失させることができ、しかもかかるマーカー遺伝子の機能の発現・消失を、その導入された植物細胞に由来する組織の形態変化により検出することができる、植物への遺伝子導入用ベクターを提供することにある。

## 発 明 の 開 示

本発明の目的は、マーカー遺伝子として形態異常誘導遺伝子を用い、また脱離

能を有するDNA因子を発現誘導型の調節因子の制御下において、形態異常誘導遺伝子がこの脱離能を有するDNA因子と挙動を一つにする位置に存在し、かつ、目的遺伝子がこの脱離能を有するDNA因子とは挙動を一つにすることのない位置に存在するようベクターを構築することにより、達成することができる。

以下、本発明について詳細に説明する。

ここで形態異常誘導遺伝子とは、植物の組織に、矮化、頂芽優勢の崩壊、色素の変化、根頭癌腫、毛状根、葉の波打ち等の、通常と異なる形態分化を引起こす遺伝子を意味する。例えば、これらの形態異常誘導遺伝子としては、すでに、i p t (isopentenyltransferase) 遺伝子 (A. C. Smigocki, L. D. Owens, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85:5131, 1988)、i a a M (tryptophan monooxygenase) 遺伝子 (H. J. Klee et al., GENES & DEVELOPMENT, 1:86, 1987)、gene 5 遺伝子 (H. koerber et al., EMBO Journal, 10:3983, 1991)、gene 6 b 遺伝子 (P. J. J. Hooyaas et al., Plant Mol. Biol., 11:791, 1988)、及び r o l A ~ D の r o l 遺伝子群 (F. F. White et al., J. Bacteriol., 164:33, 1985) 等、それぞれ特異的な遺伝子が、各種の植物に癌腫、奇形腫 (すなわち不定芽・不定根等の形成) を引起こす細菌である、アグロバクテリウム等に存在していることが報告されており、また、シュードモナス・シリंगाエの亜種 (*Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi*) では i a a L (indoleacetic acid-lysine synthetase) 遺伝子 (A. Spina et al., Mol. Gen. Genet., 227:205, 1991) の存在が、さらに種々の植物からもホメオボックス遺伝子やフィトクローム遺伝子等の存在が報告されている。

これらの遺伝子は、いずれも本発明において使用することができるが、中でも特に、頂芽優勢の崩壊を引き起こす i p t 遺伝子や、毛状根の形成、及び毛状根から再生した植物の矮化や葉の波打ち等を引き起こす r o l 遺伝子群は、種々の形態異常誘導遺伝子の中でも特徴的な形態の異常を引き起こすことから、本発明に使用するマーカー遺伝子として好ましい。

さらに、これらの形態異常誘導遺伝子はまた、互いに組み合わせることにより、それが導入された特定の植物に、不定芽・不定根等の特定の構造を再分化させるよう設計することも可能である。本発明においては、このような遺伝子の組み合

わせを利用し、遺伝子導入のターゲットとなる植物の種類等、遺伝子導入植物の作成条件に応じて形態異常誘導遺伝子を構築し、用いることもできる。

また、脱離能を有するDNA因子とは、これらが存在し、機能する染色体DNA等から、それ自身が脱離し得る能力を有するDNA配列をいう。植物ではこのような因子として、染色体上に存在するトランスポゾンと呼ばれるものが知られており、その構造と働き、そしてその挙動もほぼ判明している。すなわち、トランスポゾンが機能するためには、原則として、その内部にある遺伝子から発現し、それ自身の脱離及び転移を触媒する酵素（転移酵素）と、やはりその内部の末端領域に存在し、この転移酵素が結合し作用するDNA配列という、2つの構成要素が必要とされる。これらの働きにより、トランスポゾンはその存在する染色体上から脱離し、その後、普通はDNA上の新たな位置に転移するが、一定の確率で転移できぬままその機能を失い、消失等する場合も生ずるので、本発明ではこのようなトランスポゾンの転移ミスを利用する。

なお、トランスポゾンには、このような自律性トランスポゾン、すなわち、転移酵素とDNA結合配列という2つの要素を保持していて、トランスポゾン内部から発現する転移酵素が末端領域に存在するDNA配列に結合して作用することにより、自律的にその存在する染色体上から脱離して転移しうるものの他、非自律性トランスポゾンと呼ばれるタイプもある。この非自律性トランスポゾンとは、転移酵素が結合し作用する末端のDNA配列は保持しているものの、内部にある転移酵素遺伝子に変異が生じており、転移酵素の発現がないため、自律的に染色体上から脱離することができないものをいうが、しかし、非自律性トランスポゾンも、自律性トランスポゾンあるいはこれとは独立して存在する転移酵素遺伝子から転移酵素が供給されると、自律性トランスポゾンと同様の挙動を示すこととなる。

従って、本発明においては、自律性、非自律性のいずれのトランスポゾンを使用することもできる。つまり、非自律性のトランスポゾンを用いる場合には、その内部に、形態異常誘導遺伝子の他、自律性トランスポゾン等から取得、または合成した転移酵素遺伝子を挿入して使用すればよい。

現在、単離されている自律性トランスポゾンとしては、トウモロコシより単離

された A c と S p m があり、詳細な解析がなされている (A. Gieri and H. Saedler, *Plant Mol. Biol.*, 19:39, 1992)。とりわけ A c は、トウモロコシの染色体中、w x - m 7 遺伝子座を制限酵素 S a u 3 A で切出すことにより得ることができる (U. Behrens et al., *Mol. Gen. Genet.*, 194:346, 1984)、植物トランスポゾンの中では最も解析の進んでいる自律性トランスポゾンであり、その DNA シーケンスも既に解明されているので (M. Mueller-Neumann et al., *Mol. Gen. Genet.*, 198:19, 1984) 当業者が容易に取得可能なことから、本発明に使用する DNA 因子として相応しい。また、非自律性トランスポゾンとしては、それぞれ A c、S p m の内部領域が欠損したものである、D s や d S p m を始め (H. -P. Doering and P. Starlinger, *Ann. Rev. Genet.*, 20:175, 1986) 種々のものが、トウモロコシ以外にも、キンギョソウ、アサガオ等の多くの植物から単離されている (例えば、Y. Inagaki et al., *Plant Cell*, 6:375, 1994)。ちなみに、これらのトランスポゾンは、その由来する植物と異なる種類の植物の染色体に導入された場合でも、その能力を発揮して脱離し、転移することが多くの例で知られている (例えば、B. Baker et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83:4844, 1986)。

さらに、植物以外に存在する脱離能を有する DNA 因子としては、部位特異的組換え系 (site-specific recombination system) に由来するものが知られている。この部位特異的組換え系は、特徴的な DNA 配列を有する組換え部位 (本発明の脱離能を有する DNA 因子にあたる。)、及びこの DNA 配列 (組換え配列) に特異的に結合して、その配列が 2 以上存在したとき、その配列間の組換えを触媒する酵素、という 2 つの要素からなっており、そして、この組換え配列が同一 DNA 分子上に、同一方向を向いてある一定の間隔で 2 か所存在している場合には、これに挟まれた領域がこの DNA 分子 (プラスミド、染色体等) から脱離し、またこの配列が対向する方向を向いて 2 か所存在している場合には、この領域が反転する、という挙動を示す。本発明では、この前者の脱離作用を利用するが、このような組換え部位の脱離・反転は、部位特異的組換え系によるいわゆる相対的組換えの結果として生ずるものであり、これが、転移の過程としてその脱離を起こす、トランスポゾンを用いた場合の機構とまったく異なる点である。



なお組換え酵素をコードする遺伝子は、必ず組換え部位と同一のDNA分子上に存在する必要はなく、これと同一細胞内に存在し、発現していさえすれば、この組換え配列間の脱離・反転を生ぜしめ得ることが知られている (N. L. Craig Annu. Rev. Genet.、22:77、1988)。

現在、部位特異的組換え系はファージ、細菌 (例えば大腸菌)、酵母等の微生物から分離された *Cre/lox* 系、*pSR1* 系、*FLP* 系、*cer* 系、*fim* 系等が知られているが (総説として、N. L. Craig、Annu. Rev. Genet.、22:17、1988)、高等生物ではまだその存在を知られていない。しかし、これらの微生物から分離された部位特異的組換え系も、*P1* ファージ由来の *Cre/lox* 系が植物への遺伝子導入用ベクターに利用されて、植物中でもその機能を発揮するなど (国際公開W093/01283号公報)、その由来する生物種と異なる生物種 (植物を含む) に導入された場合でも、そのそもそもの生物内における挙動と同一の挙動をとることが知られている。ちなみに本発明の実施例では、酵母 (*Zygosaccharomyces rouxii*) の部位特異的組換え系である *pSR1* 系 (H. Matsuzaki et al.、J. Bacteriology、172:610、1990) を、その組換え部位に組換え酵素を挿入して利用したが、この *pSR1* 系もまた、高等植物においてその本来の機能を発揮することがすでに報告されている (H. Onouchi et al.、Nucleic Acid Res.、19:6373、1991)。

本発明においては、この脱離能を有するDNA因子を発現誘導型の調節因子の制御下におく。

即ち、細菌等の原核生物から酵母、カビ、高等植物、哺乳類等の真核生物に至る全ての生物の遺伝子には、その構造遺伝子の上流領域に発現誘導型の調節因子が存在し、これらが単独で、あるいは幾つかが協働して機能することにより、ある遺伝子または遺伝子群の発現を制御しており、例えば、時には個体の分化や発育のステージに応じ、時には熱、光、金属等の様々な環境要因に応じて、遺伝子発現のオン・オフを行っている。本発明ではこのような働きを有する発現誘導型の調節因子を利用し、この下流域に脱離能を有するDNA因子を配置して、その発現、つまりは脱離能を制御するのである。

かかる発現誘導型の調節因子としては現在までに、化学物質に反応するものと

してグルタチオン-S-トランスフェラーゼ I 系遺伝子のプロモーター (特開平 5-268965号公報)、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ II 系 (GST-II) 遺伝子のプロモーター (国際公開W093/01294号公報)、Tet リプレッサー 融合型カリフラワーモザイクウィルス 35S プロモーター (C. Gatz et al., Mol. Gen. Genet., 227:229, 1991)、Lac オペレーター/リプレッサー系プロモーター (R. J. Wilde et al., The EMBO Journal, 11:1251, 1992)、alcR / alcA 系プロモーター (国際公開W094/03619号公報)、グルコシルコリド 系プロモーター (青山卓史、蛋白質 核酸 酵素、41:2559, 1996) 等が、熱に 反応するものとして hsp 80 プロモーター (特開平5-276951号公報) 等が、そ して光に反応するものとしてリブローズ 2 リン酸カルボキシラーゼ小サブユニッ ト遺伝子 (rbcS) のプロモーター (R. Fluhr et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U SA, 83:2358, 1986)、フルクトース-1, 6-ビスホスファターゼ遺伝子のプ ロモーター (特表平7-501921号公報)、集光性クロロフィル a/b 結合タンパク 質遺伝子のプロモーター (特開平5-89号公報) 等が知られている。

このうち、高等植物の発現誘導型調節因子として最も研究が進んでいるのは rbcS のプロモーターであり、Chua らにより詳細な解析が行われている (例 えば、松岡、植物細胞工学臨時増刊、3:552, 1991を参照)。それ故、本発明の 実施例 1 でもこの調節因子を使用した、この因子がいかにして光による遺伝子 発現調節を行うかは、現状ではまだ確定していない。一方、GST-II 遺伝子 のプロモーターを代表とする化学物質反応性のプロモーターは、遺伝子発現の誘 導を化学物質の存在量によって比較的自由に制御できるため、熱や光を調節して 遺伝子発現を制御しなければならない、熱あるいは光反応性のプロモーターより も、実用上、使いやすいというメリットを有する。

なお本発明において、形態異常誘導遺伝子を挿入する場所は、脱離能を有する DNA 因子と共に、これが脱離し得る位置でありさえすればよい。例えば、脱離 能を有する DNA 因子としてトランスポゾンを用いた場合には、転移酵素遺伝子 のプロモーター領域より上流で、この転移酵素が結合する末端領域よりは下流の、 トランスポゾンの脱離に影響を及ぼさない位置にこれを挿入することができる。 また pSR1 系を用いた場合には、組換え配列に挟まれた領域内で、組換え酵素

の発現を阻害しない位置でありさえすれば、これをどこにでも挿入することができる。

本発明のベクターは、遺伝子工学的手法により遺伝子導入が可能な、いかなる植物においても用いることができ、また、本発明のベクターにより植物に導入できる目的遺伝子は、農業的に優れた形質を付与できる遺伝子、農業的に優れた形質を付与するとは限らないが、遺伝子発現機構の研究に必要とされる遺伝子等、目的に応じて種々選択することができる。

また、かかる目的遺伝子のプロモーター、ターミネーターについては、植物において機能するものでありさえすれば、別に制限なく使用することができる。例えば、このようなプロモーターとしては、カリフラワーモザイクウイルスの35Sプロモーター (J.T.Odell et al., Nature (London), 313:810, 1985)、ノバリン合成酵素のプロモーター (W.H.R.Langridge et al., Plant Cell Rep., 4:355, 1985) 等を、またターミネーターとしては、ノバリン合成酵素のポリアデニル化シグナル (A.Depicker et al., J.Mol.Appl.Gen., 1:561, 1982)、オクトピン合成酵素のポリアデニル化シグナル (J.Gielen et al., EMBO J., 3:835, 1984) 等を使用することができる。

さらに、本発明において使用する遺伝子、すなわちDNAは、cDNAまたはゲノムDNAのクローニングにより得ることができるが、あらかじめそのシーケンスが明らかにされているものであれば、これを化学合成して得ることもできる。

本発明のベクターは、植物に感染するウイルスや細菌を介して、植物細胞に間接的に導入することができる (I.Potrykus, Annu. Rev. Plant Physiol. Pla Mol. Biol., 42:205, 1991)。この場合、例えば、ウイルスとしては、カリフラワーモザイクウイルス、ジェミニウイルス、タバコモザイクウイルス、ブロムモザイクウイルス等が使用でき、細菌としては、アグロバクテリウム・ツメファシエンス (以下、A. ツメファシエンスと略す。)、アグロバクテリウム・リゾジェネス等が使用できる。なおアグロバクテリウム属は、一般に単子葉植物には感染せず、双子葉植物にのみ感染するとされているが、最近では、これらを単子葉植物へ感染させて遺伝子導入を行った例も報告されている (例えば、国際公開W094/00977号公報)。

本発明のベクターはまた、マイクロインジェクション法、エレクトロポレーション法、ポリエチレングリコール法、融合法、高速バリスティックペネトレーション法等の物理的・化学的手法によっても、植物細胞に直接導入することができる (I. Potrykus, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., 42:205, 1991)。単子葉植物の多くやアグロバクテリウムの感染しにくい双子葉植物に対しては、遺伝子導入法として汎用されているアグロバクテリウムを用いた間接導入法が使用できないため、これらの直接導入法が有効である。

#### 〔作用〕

本発明において、マーカー遺伝子として用いた形態異常誘導遺伝子は、これが発現することにより、その導入された植物細胞において、植物成長ホルモンの異常生産等、その細胞内の生理状態に異常をもたらし、結果としてその増殖・分化の方向を狂わせ、これに由来して形成される組織に様々な形態異常を引き起こす。つまり、ここで生じる異常な形態をした組織、例えば頂芽優勢の崩れた無秩序な芽の集合体（多芽体）や毛状根等は、こうした形態異常誘導遺伝子が導入された細胞に由来し、これが異常な増殖・分化をした結果生じたものである。従って、これをマーカー遺伝子として目的遺伝子と共にベクターを構築し、このベクターを植物細胞に導入してこの細胞を培養しさえすれば、これから生じる異常な形態を示す組織を肉眼で選抜することのみにより、マーカー遺伝子、つまりは目的遺伝子が導入された細胞だけからなる組織を選抜できることとなる。

さらに本発明では、この形態異常誘導遺伝子を、発現誘導型の調節因子の制御下におかれた脱離能を有するDNA因子と挙動を一つにする位置に組込んで用いる。かかる構成を有するベクターを用いて植物に遺伝子を導入すれば、導入後、その植物細胞に熱、光、化学物質等、使用した発現誘導型調節因子に応じた適当な刺激を人為的に加えることで、脱離能を有するDNA因子を発現させることができ、その結果、マーカー遺伝子である形態異常誘導遺伝子はこのDNA因子と共に、それらが導入され機能していたDNA上から、一定の確率で脱離してその機能を失い、一方、これとは挙動を一つにしない目的遺伝子は同じDNA上に残留して機能を保持し続ける、つまり、目的遺伝子のみが発現可能に導入されてい

る細胞が得られることになる。

しかもこのマーカー遺伝子、つまり形態異常誘導遺伝子の機能の消失は、遺伝子導入の際と同様に、遺伝子導入組織の形態の変化として肉眼で検出できることから、マーカー遺伝子の機能の消失した細胞だけからなる組織、換言すれば、目的遺伝子のみが発現可能に導入されている細胞だけからなる組織は、确实・容易に選抜できることとなる。すなわち、かかる細胞だけからなる組織を得るためには、まず、遺伝子導入処理後の細胞を培養して、形態異常誘導遺伝子の発現により生じてくる多芽体、毛状根等、異常な形態を示す組織を肉眼で選抜し、これを分離する。そして、その分離した組織の培養中に、必要に応じて、使用した発現誘導型調節因子に応じた適当な刺激を加えてやれば、これらの形態異常を示す組織から今度は正常な形態を示す組織が生じてくるので、これをやはり肉眼で選抜すればよい。

#### 図面の簡単な説明

図1は、pNPI206作成スキムのうち、pNPI201の作成までを示す図である。図2は、pNPI206作成スキムのうち、pNPI201からpNPI203の作成までを示す図である。図3は、pNPI206作成スキムのうち、pNPI203からpNPI204の作成までを示す図である。図4は、pNPI206作成スキムのうち、pNPI204からpNPI206の作成までを示す図である。図5は、pNPI206の構造のうち、T-DNA領域の制限酵素地図である。図6は、pNPI125の作成スキムである。図7は、pNPI128の作成スキムである。図8は、pNPI123作成スキムのうち、pIPT2の作成までを示す図である。図9は、pNPI123作成スキムのうち、pIPT2からpIPT3の作成までを示す図である。図10は、pNPI123作成スキムのうち、pIPT3からpIPT4の作成までを示す図である。図11は、pNPI123作成スキムのうち、pIPT4からpNPI123の作成までを示す図である。図12は、pNPI303作成スキムのうち、pNPI200及びpG1E7からpNPI301の作成までを示す図である。図13は、pNPI303作成スキムのうち、pNPI123及びpNPI128からpI

PT 8の作成までを示す図である。図14は、pNPI 303作成スキムのうち、pNPI 301及びpIPT 8からpNPI 302の作成までを示す図である。図15は、pNPI 303作成スキムのうち、pNPI 302からpNPI 303の作成までを示す図である。

## 発明を実施するための最良の形態

### 〔実施例〕

以下に、本発明を実施例に基づいて説明する。なお、以下の実施例において、更に詳細な実験操作は、特に述べる場合を除き、モレキュラー・クローニング第2版 (Sambrook et al. eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989)、又は製造業者の取扱い説明書に従い行われた。

### 〔実施例1〕

#### 1. ベクターの作成

特願平7-313432において得られたpNPI 125より、酵母の部位特異的組換え系 (pSR1系) の組換え酵素遺伝子 (以下、R遺伝子とする。) とこれに連結されたノバリン合成酵素ポリアデニル化シグナルを制限酵素 XbaI 及び EcoRI で切出し、これをpHSG 398 (宝酒造 (株) より購入) の XbaI - EcoRI 制限酵素部位間に挿入してプラスミドpNPI 200を得た。

一方、リブ्रोース-1、5-ビスリン酸カルボキシラーゼ小サブユニット遺伝子のプロモーター (rbcS-3B) を含むプラスミド (名古屋大学 杉田護氏より譲渡) を制限酵素 KpnI で切断し、その切断により生じた突出末端をT4ポリメラーゼI (大サブユニット) にて平滑化した後、ここに5'リン酸化 SaI リンカーを挿入してプラスミドpRBCSを作成し、このpRBCSから rbcS-3B を制限酵素 SaI で切出してpNPI 200の SaI 制限酵素部位に挿入し、プラスミドpNPI 201を得た。

なお、この rbcS-3B は、トマト (Lycopersicon esculentum VFNT LA1221) に由来する光反応性のプロモーターである。トマトは rbcS の発現誘導型調節因子として、この他に5種類の同様のプロモーターを有しているが (rbcS-1、-2、-3、-3A、-3C)、その発現様式は杉田らにより解析

されている (M. Sugita et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84:7104, 1987)。

次に、この pNPI 201 を制限酵素 PstI 及び BamHI で切断し、その突出末端を T4 ポリメラーゼ I (大サブユニット) にて平滑化した後、再連結して、これをプラスミド pNPI 202 とした。この pNPI 202 より、rbcS-3B、R 遺伝子及びノバリン合成酵素ポリアデニル化シグナルを含む断片を制限酵素 EcoRI と HindIII で切出し、これを pUC119 (宝酒造 (株) より購入) の EcoRI-HindIII 制限酵素部位間に挿入して、プラスミド pNPI 203 を作成し、さらにこの pNPI 203 より、再び rbcS-3B、R 遺伝子及びノバリン合成酵素ポリアデニル化シグナルを含む断片を制限酵素 EcoRI と HindIII で切出して、特願平 7-313432 において得られた pNPI 128 の EcoRI-HindIII 制限酵素部位間に挿入することにより、プラスミド pNPI 204 を得た。

そしてこの pNPI 204 の HindIII 制限酵素部位に、やはり特願平 7-313432 において得られた pNPI 123 より制限酵素 HindIII にて切出した、カリフラワーモザイクウイルス 35S プロモーター (CaMV35S プロモーター) とこれに連結された ipt 遺伝子を含む断片を挿入して、プラスミド pNPI 205 を得た。

目的とするベクターは、この pNPI 205 から、CaMV35S プロモーターに連結された ipt 遺伝子、rbcS-3B に連結された R 遺伝子及びノバリン合成酵素ポリアデニル化シグナル、そしてこれらの両端にある酵母の部位特異的組換え系の組換え配列 Rs を制限酵素 PstI で切出して、植物への遺伝子導入用ベクタープラスミド pBI121 (東洋紡績 (株) より購入) の SseI 制限酵素部位に挿入することにより得られ、これをプラスミド pNPI 206 と命名した。このプラスミドを有する A. ツメファシエンスを植物に感染させた場合、その構造の内、いわゆる T-DNA 領域と呼ばれる RB サイトと LB サイトの内側、ここでは nptII 遺伝子 (ネオマイシンリン酸化酵素遺伝子) 部位から GUS 遺伝子 ( $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子) 部位にかけての約 12.5 kb の領域が植物染色体に組込まれることになる。

なお、このプラスミド pNPI 206 は、大腸菌 (Escherichia coli) JM1

09株に導入し、この大腸菌をE. coli JM109 (pNPI206) [通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所 (〒305 日本国茨城県つくば市東一丁目1番3号)、国際受託番号: FERM BP-5518、平成8年(1996年)4月24日にブタベスト条約に基づく原寄託)として、国際寄託に付した。

pNPI206の作成スキムを図1~4に、そのT-DNA領域の制限酵素地図を図5に示す。また、pNPI125の作成スキムは図6、pNPI128の作成スキムは図7、pNPI123の作成スキムは図8~11に示した。なお、これらの図中、35S-Pはカリフラワーモザイクウィルスの35Sプロモーター、NOS-Pはノバリン合成酵素のプロモーター、Tは同じくノバリン合成酵素のポリアデニル化シグナル、丸で囲ったTは*i p t*遺伝子自身のポリアデニル化シグナルであり、網かけした三角形は組換え配列R sとその配列方向を表している。

図5より明らかなように、このプラスミドはT-DNA領域、即ち植物染色体に組込まれることになる領域内に、マーカー遺伝子として*i p t*遺伝子を、目的遺伝子のモデルとして*n p t I I*遺伝子及びGUS遺伝子を有している。この*i p t*遺伝子は、病原性A. ツメファシエンスが保持する腫瘍化遺伝子の一員であり、これを植物細胞に導入すると、植物ホルモンの一種であるサイトカイニンの過剰生産が起こり、その細胞の分化の方向が多芽体形成に向かうことになる。また、*n p t I I*遺伝子はカナマイシン抵抗性に寄与する遺伝子として、GUS遺伝子はこれを有する細胞が特殊な基質を代謝して青色の色素を生産することから、ともに植物における遺伝子発現の解析に汎用されている遺伝子である。

そして、このプラスミドにおいて脱離能を有するDNA因子として機能するのは、酵母の部位特異的組換え系であるpSR1系の組換え配列、R s間の領域であり、それ故、*i p t*遺伝子は、同一方向を向いたこの二つの組換え配列R sに挟まれた形で挿入されている。しかし同時に、R s間の脱離を触媒する酵素の遺伝子であるR遺伝子は発現誘導型の調節因子、即ち光反応性プロモーターr b c S-3 Bの下流域に連結されており、そのためこのプロモーターの制御を受けて、適当な光条件下でなければこれが発現しないように、つまりR s間の脱離が起こ



らないようになっている。

## II. アグロバクテリウムへの pNPI 206 の導入

A. ツメファシエンス LBA 4404 (CLONTECH 社より購入) 株を、10 ml の YEB 液体培地 (ビーフエキス 5 g/l、酵母エキス 1 g/l、ペプトン 1 g/l、ショ糖 5 g/l、2 mM  $MgSO_4$ 、22℃での pH 7.2 (以下、特に示さない場合は、22℃での pH とする。)) に接種し、 $OD_{630}$  が 0.4 から 0.6 の範囲に至るまで、28℃で培養した。培養液を  $6900 \times g$ 、4℃、10 分間遠心して集菌した後、菌体を 20 ml の 10 mM Tris-HCl (pH 8.0) に懸濁して、再度  $6900 \times g$ 、4℃、10 分間の遠心で集菌し、次いでこの菌体を  $200 \mu l$  の YEB 液体培地に懸濁して、これをプラスミド導入用菌液とした。

アグロバクテリウムへのプラスミド pNPI 206 の導入は、15 ml チューブ (ファルコン社) 内で、このプラスミド導入用菌液  $200 \mu l$  と 1 で作成した pNPI 206  $6 \mu g$  を混合し、これを、あらかじめ液体窒素中で 30~40 分間冷却しておいたエタノールにチューブごと 5 分間浸して冷却した後、29℃の水浴中に 25 分間置き、次いで、 $750 \mu l$  の YEB 液体培地を加えて、29℃で 1 時間、振盪培養することにより行った。

## III. アグロバクテリウムからタバコへの pNPI 206 の導入

### 及び pNPI 206 が導入されたタバコ細胞の培養と得られた組織の形態

温室内で生育させたタバコ (*Nicotiana tabacum* cv. SRI) の成葉を、1 v/v % 次亜塩素酸ナトリウム水溶液に 5 分間浸漬して殺菌し、滅菌水で 3 回洗浄した後、中脈を取り除いて約 8 mm 角の葉片となるように調製した。

このタバコ葉片を、II において pNPI 206 を導入した A. ツメファシエンス LBA 4404 の菌液 ( $OD_{630} = 0.25$ 、YEB 液体培地にて一夜培養後、滅菌水で希釈して菌体濃度を調整。) に約 1 分間浸してこれに感染させ、滅菌した濾紙の上に置いて余分な菌液を除いてから、アセトシリゴン  $50 mg/l$  を添加した植物ホルモンを含まない (ホルモンフリー) MS 寒天培地 (T. Murashige and F. Skoog, *Physiol. Plant.*, 15:473, 1962、但し、寒天 0.8 w/v % を添加。) に、葉の裏が上になるように置床して、暗所で 3 日間、25

℃（以下、特に記さない限り、植物組織の培養温度は全て 25℃にて行った。）で培養した。次いで、これを、カルベニシリン 500 mg/l のみを含むホルモンフリー MS 寒天培地に移植し、光量約  $7 \sim 10 \mu \text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$  で、同組成の培地に植え継ぎをしつつ培養したところ、感染 3 ヶ月後には多芽体 225 系統を得ることができたので、内 126 系統を 2 分割して、それぞれ、光量約  $7 \sim 10 \mu \text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$  又は光量約  $70 \mu \text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$  の条件下、同組成の培地を用いてさらに培養を続けた。

その結果、光量約  $70 \mu \text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$  で培養した系統においては、感染から約 6 ヶ月後に 43 系統の多芽体から、肉眼で見て正常な形態をしたシュート（以下、正常体という。）が発生したが、光量約  $7 \sim 10 \mu \text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$  で培養した系統では、同じ期間の経過後に 12 系統が正常体を発生させたのみであった。

結果を表 1 に示す。

表 1. pNP1206 形質転換タバコ培養組織における正常体の発生率と光条件

光条件 <sup>*1</sup>	光条件を検討した多芽体の系統数	正常体を発生させた系統数	正常体発生率 [%] <sup>*2</sup>
L2→L1	1 2 6	4 3	3 4 . 1
L2→L2	1 2 6	1 2	9 . 5

L 2 条件で 3 ヶ月培養後、L 1 または L 2 条件で 3 ヶ月培養

\* 1 光条件

L 2 : 光量約  $7 \sim 10 \mu \text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$ L 1 : 光量約  $70 \mu \text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$ \* 2 (正常体を発生させた系統数 / 光条件を検討した多芽体の系統数)  $\times 100$

この表より明らかなように、本発明のベクター pNPI 206 により遺伝子導入したタバコ培養組織を、低光量条件で培養した後、高光量条件で培養した場合には、低光量条件で培養を続けた場合に対し、正常体発生率が4倍近く高く、この pNPI 206 により遺伝子導入された組織において、マーカー遺伝子である形態異常誘導遺伝子の挙動が、脱離能を有する DNA 因子の制御に用いた、光反応性プロモーターである rbcS-3B により制御され、遺伝子導入組織を低光量条件から高光量条件に移すことにより、その脱離が促進されたことを示している。

## [実施例 2]

### 1. ベクターの作成

実施例 1 で得られた pNPI 200 を Pst I で切断し、その切断により生じた両突出末端を T4 ポリメラーゼ I (大サブユニット) にて平滑化した後、ここに、pG1E7 (ZENECA 社より譲渡) から制限酵素 Nde I で切出し、やはりその両突出末端を T4 ポリメラーゼ I (大サブユニット) にて平滑化させた、GST-I I の 27 kD サブユニット遺伝子 (GST-I I-27) のプロモーター (特表平 6-511385 号公報 第 7 頁右下欄第 15~17 行。) を挿入して、プラスミド pNPI 300 を作成した。続いて、この pNPI 300 から、GST-I I-27 プロモーター、R 遺伝子及びノバリン合成酵素ポリアデニル化シグナルを含む断片を制限酵素 EcoRI で切出し、これを pUC18 (宝酒造 (株) より購入) の EcoRI 制限酵素部位に挿入して、プラスミド pNPI 301 を得た。

なお、GST-I I とは、除草剤解毒性に関与する GST のアイソザイムのうちの一つであって、トウモロコシ等に存在する酵素である。また、GST-I I-27 プロモーターは、この GST-I I のサブユニットのうち、27 kD サブユニットの遺伝子発現を制御しており、除草剤解毒剤、例えば 2, 2, 5-トリメチル-3-(ジクロロアセチル)-1, 3-オキサゾリジンや、その類縁体等の化学物質の存在下、GST-I I-27 の発現を誘導することにより GST-I I 活性を劇的に上昇させ、除草剤に対する抵抗性を高めることが、このトウモロコシなどにおいて知られている (特表平 6-511385 号公報)。

一方、pNPI123より、CaMV35Sプロモーターとこれに連結された*ipt*遺伝子を制限酵素HindIIIで切出し、これを、pNPI128のHindIII制限酵素部位に挿入して、プラスミドpIPT8を作成した。そして、このpIPT8のEcoRI制限酵素部位に、pNPI301より制限酵素EcoRIにて切出した、GST-II-27プロモーター、R遺伝子及びノバリン合成酵素ポリアデニル化シグナルを含む断片を挿入し、プラスミドpNPI302を得た。

目的とするベクターは、このpNPI302から、CaMV35Sプロモーターに連結された*ipt*遺伝子、GST-II-27プロモーターに連結されたR遺伝子及びノバリン合成酵素ポリアデニル化シグナル、そしてこれらの両端にある酵母の部位特異的組換え系の組換え配列Rsを制限酵素SseIで切出し、植物への遺伝子導入用ベクタープラスミドpBI121のSseI制限酵素部位に挿入することにより得られ、これをプラスミドpNPI303と命名した。即ち、このpNPI303は、R遺伝子の調節因子として、pNPI206で用いた*rbcs-3B*に代え、GST-II-27プロモーターを用いたものである。図12～15に、pNPI303の作成スキムを示す。これらの図中、用いた記号は図1～11で用いたものと同様である。

なお、このプラスミドpNPI303もまた、大腸菌JM109株に導入し、この大腸菌をE. coli JM109 (pNPI303) (通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所 (〒305 日本国茨城県つくば市東一丁目1番3号)、国際受託番号: FERM BP-5927、平成9年(1997年)4月23日にブタベスト条約に基づく原寄託) として、国際寄託に付した。

## II. タバコへのpNPI303の導入

### 及びpNPI303が導入されたタバコの解析

実施例1のII、IIIと同様にして、プラスミドpNPI303をA. ツメファシエンスLBA4404株に導入し、このA. ツメファシエンスをタバコ葉片に感染させ、感染葉をアセトシリゴン50mg/l含有ホルモンフリーMS寒天培地に置床して、3日間明所で培養した。次いで、この感染葉を、カルベニシリンのみを500mg/l含むホルモンフリーMS寒天培地に移植し、同組成の培

地に植継ぎつつ培養を続けたところ、多芽体を得ることができたので、培養開始から2ヶ月後、得られた多芽体のうち30系統を4分割して、そのそれぞれを、2、2、5-トリメチル-3-(ジクロロアセチル)-1,3-オキサゾリジン0、10、20、30mg/lを添加した、カルベニシリン500mg/l含有ホルモンフリーMS寒天培地に置床し、正常体の発生頻度を検討した。

この2、2、5-トリメチル-3-(ジクロロアセチル)-1,3-オキサゾリジン添加培養1ヶ月後の結果を表2に示す。なお、正常体の検出は肉眼により行い、また、本実施例において目的遺伝子のモデルとして用いた、GUS遺伝子の発現を確かめるためのGUS活性試験は、Jeffersonらの方法に準拠して行った。

表 2. pNP1303形質転換タバコ培養組織における正常体の発生率と  
2,2,5-トリメチル-3-(ジクロロアセチル)-1,3-オキサリジン添加濃度

正常体 発生数	添加濃度 [mg/l]			
	0	10	20	30
系統数 <sup>*1</sup>	0	5	7	6
シュート数 <sup>*2</sup>	0 (0 <sup>*3</sup> )	5 (2 <sup>*3</sup> )	9 (4 <sup>*3</sup> )	9 (5 <sup>*3</sup> )

2,2,5-トリメチル-3-(ジクロロアセチル)-1,3-オキサリジン添加培養1ヶ月

\* 1  
\* 2  
\* 3

正常体を発生させた系統の数

正常体として生じたシュートの数

正常体として生じたシュートのうち、GUS活性を示した個体数

表2より明らかなように、2、2、5-トリメチル-3-(ジクロロアセチル)-1,3-オキサゾリジン無添加の場合には、全く正常体が発生しなかったのに対して、これを10mg/l添加することにより正常体が発生し、その発生頻度は20mg/l添加で更に上昇した。従って、この場合においても、脱離能を有するDNA因子の制御に用いた、化学物質反応性のプロモーターであるGST-I1-27プロモーターは適正に機能し、pNPI303により植物組織に遺伝子を導入してこれを適当な化学物質の存在下で培養すると、脱離能を有するDNA因子の発現を誘導し、その脱離、ひいてはマーカー遺伝子である形態異常誘導遺伝子の脱離を促すことがわかる。

一方、正常体として生じたシュートのうち、約半数はGUS活性の発現、即ち、目的遺伝子の存在と発現が確認されたものの、残りの半数ではGUS活性を検出することができなかった。この理由については、まだ明らかではないが、例えば、このpNPI303のT-DNA領域が、タバコの染色体中に隣接して幾つか導入されたとすると、T-DNA内の組換え配列Rs間ではなく、互いに異なるT-DNAに存在する組換え配列の間で相同的組換えが起こって、この配列に挟まれた領域が脱離することも考えられる。このため、脱離能を有するDNA因子とともに脱離する領域に、ipt遺伝子のみならず、GUS遺伝子が結果的に含まれることも起こり得るが、このような場合には、本実施例のように、多芽体から得られた正常体であっても、GUS活性を示さないものが出現するであろう。

なお、GUS活性を示した正常体のうち1個については、PCRを用い、DNA分析を行って、GUS遺伝子の存在と、マーカー遺伝子であるipt遺伝子及び脱離能を有するDNA因子の脱離を、DNAレベルにおいても確認した。

### 産業上の利用可能性

本発明のベクターを用いて植物細胞へ遺伝子導入を行うと、目的遺伝子と共に導入したマーカー遺伝子は、導入後、この細胞に熱、光、化学物質等の特定の刺激が与えられることにより、一定の確率で、これが存在し機能していたDNA上から脱離してその機能を失い、目的遺伝子のみが、同じDNA上に発現可能に導入されている細胞が得られる。このため、このベクターは、導入しようとする目



的遺伝子に関する部分を変更するのみで、マーカー遺伝子を始めとする他の構成に何らの変更をも加えることなく、ある一つの植物体へ遺伝子の多重導入を行うために、何度でも無制限に繰り返して用いることができる。

しかも、マーカー遺伝子として形態異常誘導遺伝子を用いたことにより、マーカー遺伝子が導入された細胞だけからなる組織、即ち、目的遺伝子が導入された細胞だけからなる組織の選抜も、そのマーカー遺伝子が機能を失った後の、目的遺伝子のみが発現可能に導入されている細胞だけからなる組織の選抜も、すべてその組織の形態変化を指標として行うことができる。従って、目的遺伝子のみが染色体等に導入されている細胞だけからなる組織を、確実・容易に選抜でき、選抜のための抗生物質等を培地中に添加する必要もないので、選抜中に植物細胞の活性低下を招くおそれもない。このため遺伝子の多重導入は効率良く行え、また、かかる細胞だけからなる遺伝子導入個体、すなわちマーカー遺伝子の影響が排除され、その遺伝子産物がもたらす危惧から完全に解放された個体も、交配過程を経ることなく得ることができる。

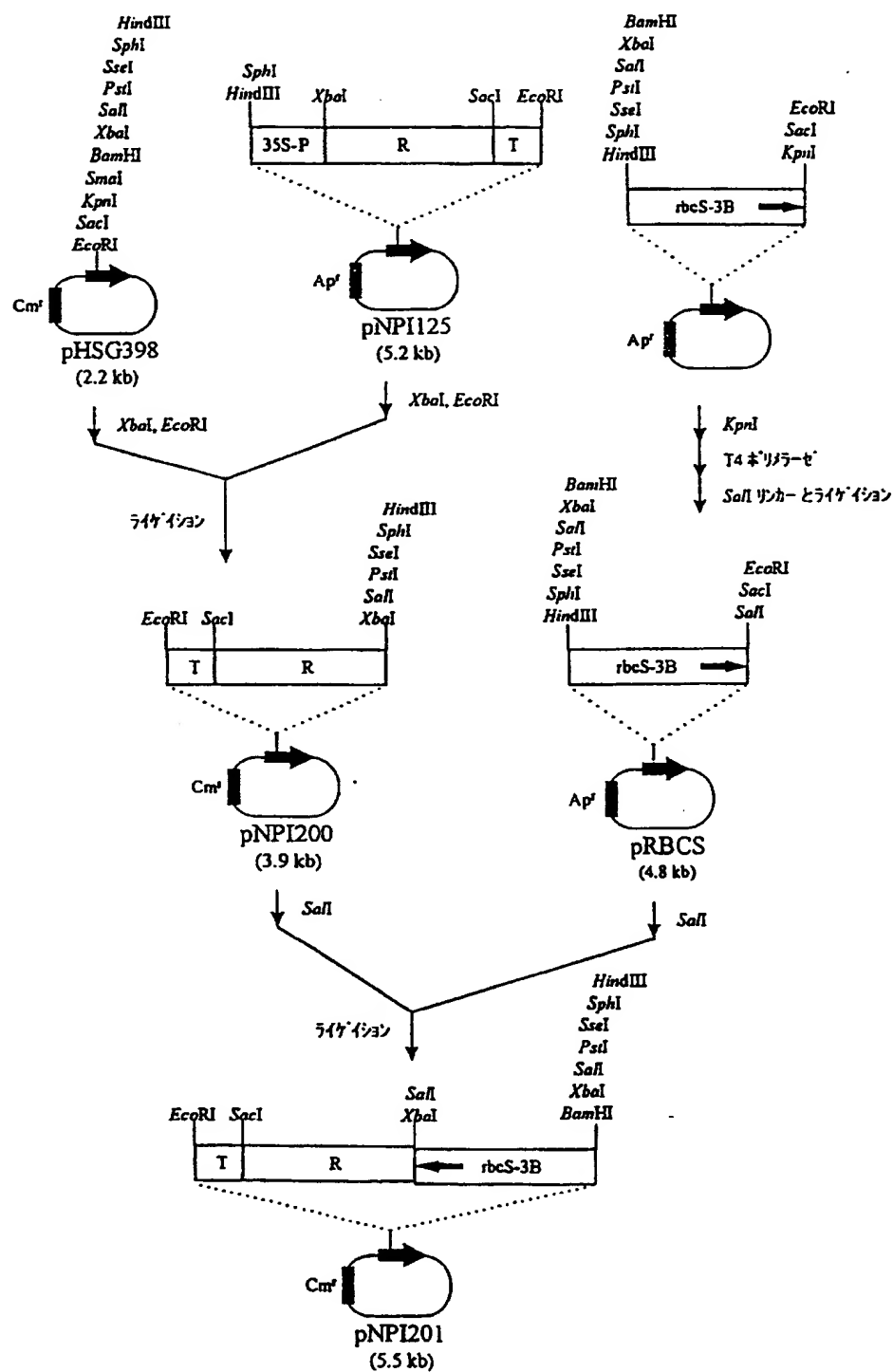
さらに、本発明のベクターにおいては、マーカー遺伝子の脱離を人為的に調節することができる。従って、このような調節ができないような場合には、マーカー遺伝子の脱離があまりにも速やかに起こるため、目的遺伝子のみが発現可能に導入されている細胞だけからなる組織の取得が却って困難となる、非常に脱離能に優れたDNA因子も、本発明の脱離能を有するDNA因子としてその能力を生かすことができる。また、そうでなくとも、本発明のベクターを用いると、かかる細胞の発生、そしてかかる細胞からなる植物組織の発生を必要に応じて同期させたり、適宜調整したりすることができるので、実際に、遺伝子導入植物を作成する上では非常に便利となる。例えば、マーカー遺伝子である形態異常誘導遺伝子として i p t 遺伝子を用いた場合には、これが導入された細胞はその働きにより、植物ホルモン無添加の条件で極めて活発に増殖し、不定芽等を分化するので、目的遺伝子のみが発現可能に導入されている細胞を望めばいつでも発生させることができる組織を、あえてその前段階のマーカー遺伝子を保持した状態で培養を続けることにより大量に生産する、ということもできるようになるのである。

## 請求の範囲

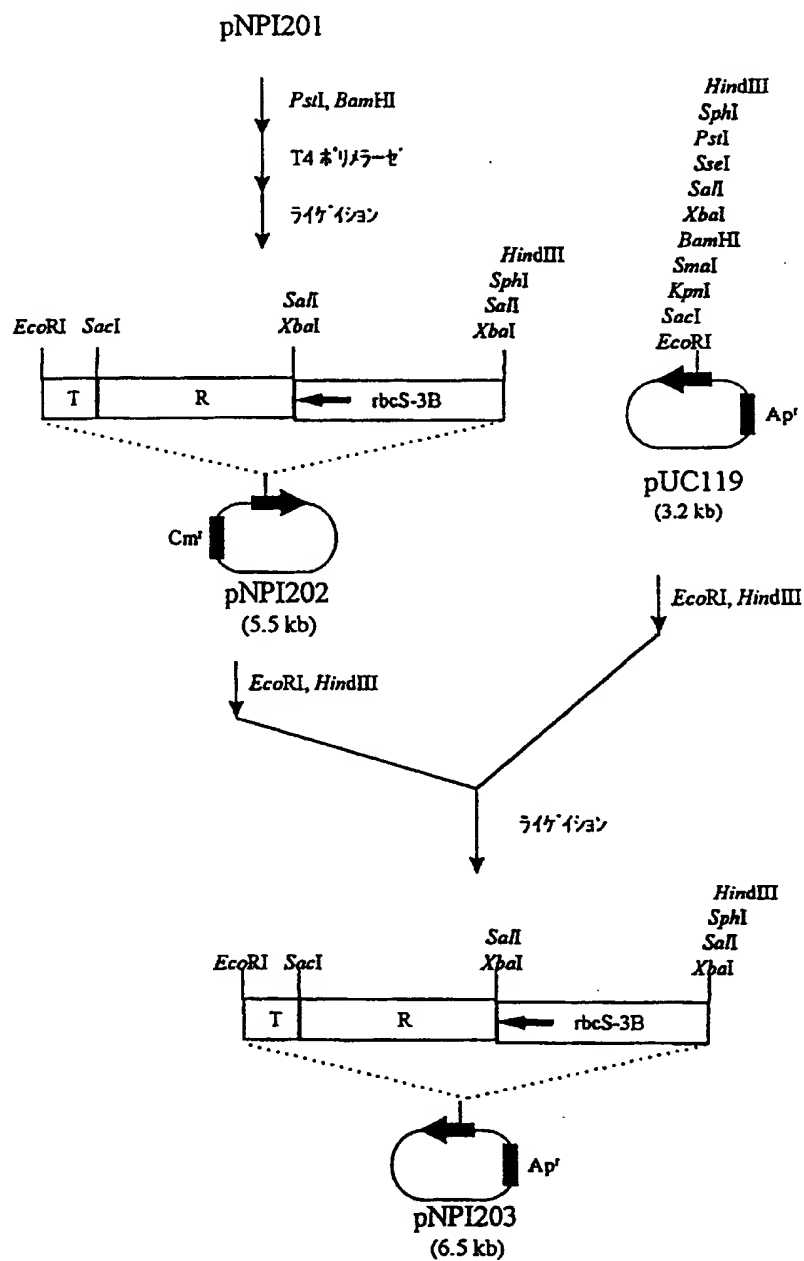
1. 目的遺伝子をマーカー遺伝子と共に植物細胞中へ導入するためのベクターであって、マーカー遺伝子が、その発現後に必要に応じて、これが存在し、機能するDNAから除去されてその機能を消失し、かつ、マーカー遺伝子の発現、及びその機能の消失が、その導入された植物細胞に由来する組織の形態変化により検出可能である、植物への遺伝子導入用ベクター。
2. 目的遺伝子、マーカー遺伝子として形態異常誘導遺伝子、及び発現誘導型の調節因子の制御下におかれた脱離能を有するDNA因子を含み、かつ、形態異常誘導遺伝子はこの脱離能を有するDNA因子と挙動を一つにする位置に存在し、また目的遺伝子はこの脱離能を有するDNA因子とは挙動を一つにすることがない位置に存在する、植物への遺伝子導入用ベクター。
3. 形態異常誘導遺伝子が脱離能を有するDNA因子の内部に存在する、請求の範囲第2項に記載の植物への遺伝子導入用ベクター。
4. 脱離能を有するDNA因子を制御する発現誘導型の調節因子が、リブローズ2リン酸カルボキシラーゼの小サブユニット遺伝子 (r b c S) のプロモーターである、請求の範囲第2項または第3項に記載の植物への遺伝子導入用ベクター。
5. 脱離能を有するDNA因子を制御する発現誘導型の調節因子が、グルタチオン-S-トランスフェラーゼII系 (GST-II) 遺伝子のプロモーターである、請求の範囲第2項または第3項に記載の植物への遺伝子導入用ベクター。
6. 脱離能を有するDNA因子が部位特異的組換え系に由来するものである、請求の範囲第2項、第3項、第4項または第5項に記載の植物への遺伝子導入用ベクター。
7. 形態異常誘導遺伝子がアグロバクテリウム属細菌の保持する形態異常誘導遺伝子である、請求の範囲第2項、第3項、第4項、第5項または第6項に記載の植物への遺伝子導入用ベクター。
8. 形態異常誘導遺伝子がサイトカイニン合成遺伝子である、請求の範囲第2項、第3項、第4項、第5項、第6項または第7項に記載の植物への遺伝子導入用ベクター。

9. サイトカイニン合成遺伝子がアグロバクテリウム・ツメファシエンス (Agrobacterium tumefaciens) の T-DNA 上に存在する i p t (isopentenyltransferase) 遺伝子である、請求の範囲第 8 項に記載の植物への遺伝子導入用ベクター。

図 1



## 図 2



## 図 3

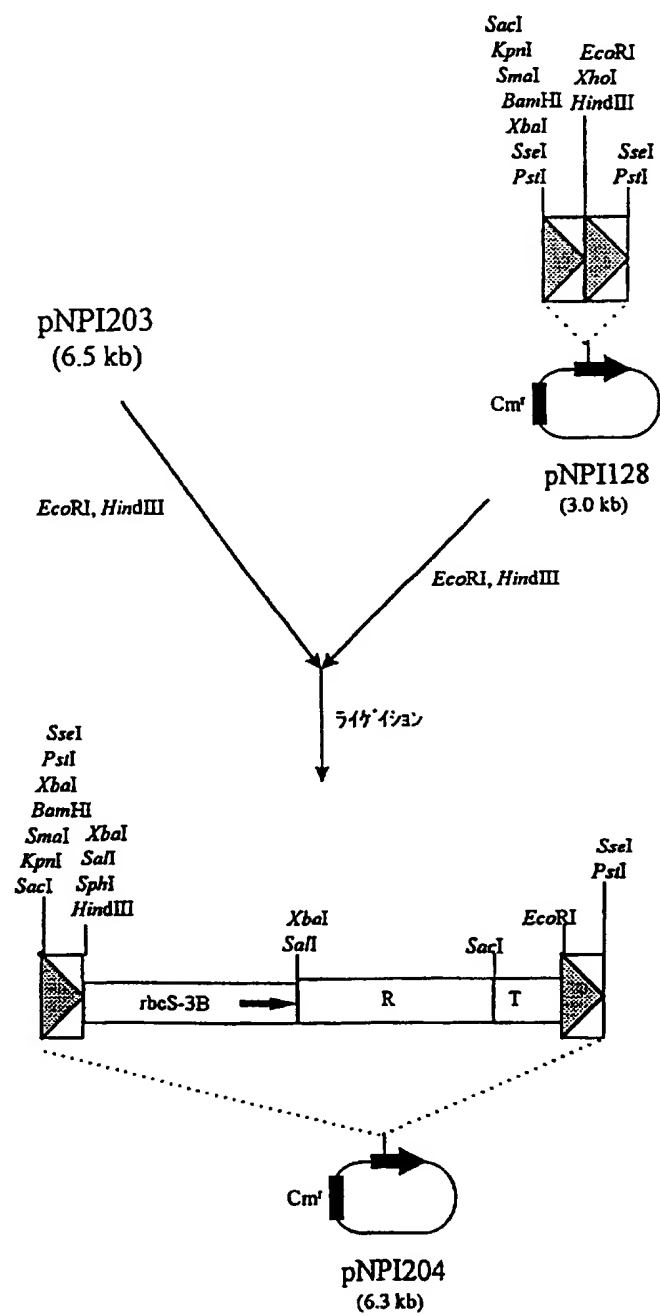


図 4

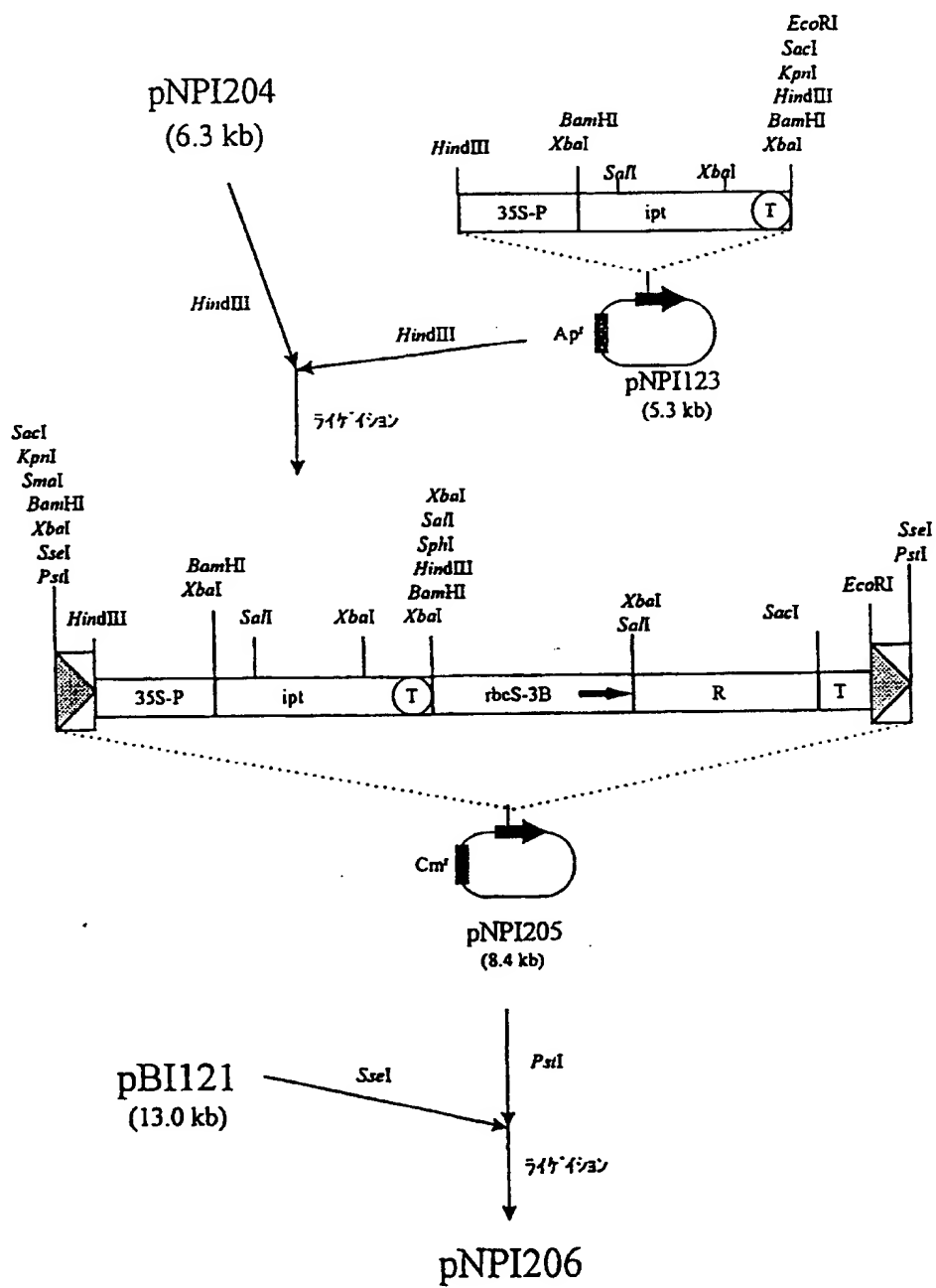
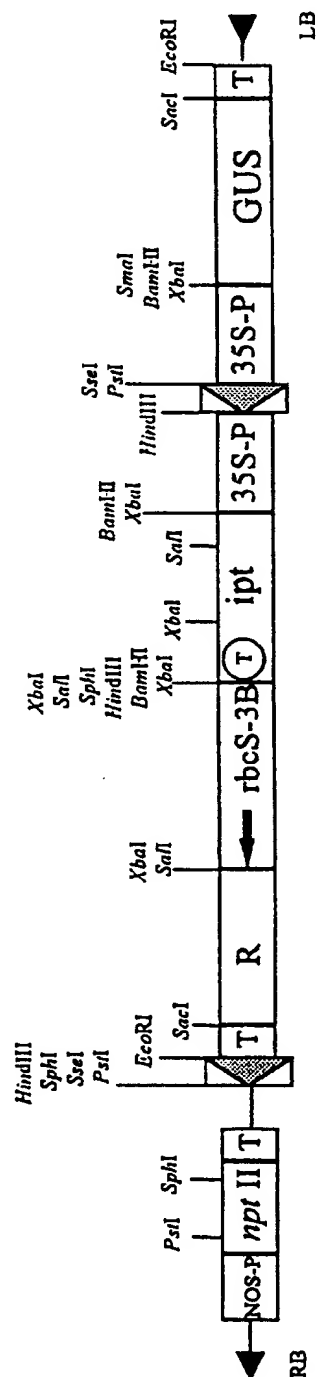


图5



pNPI206 (19.2 kb)



図 6

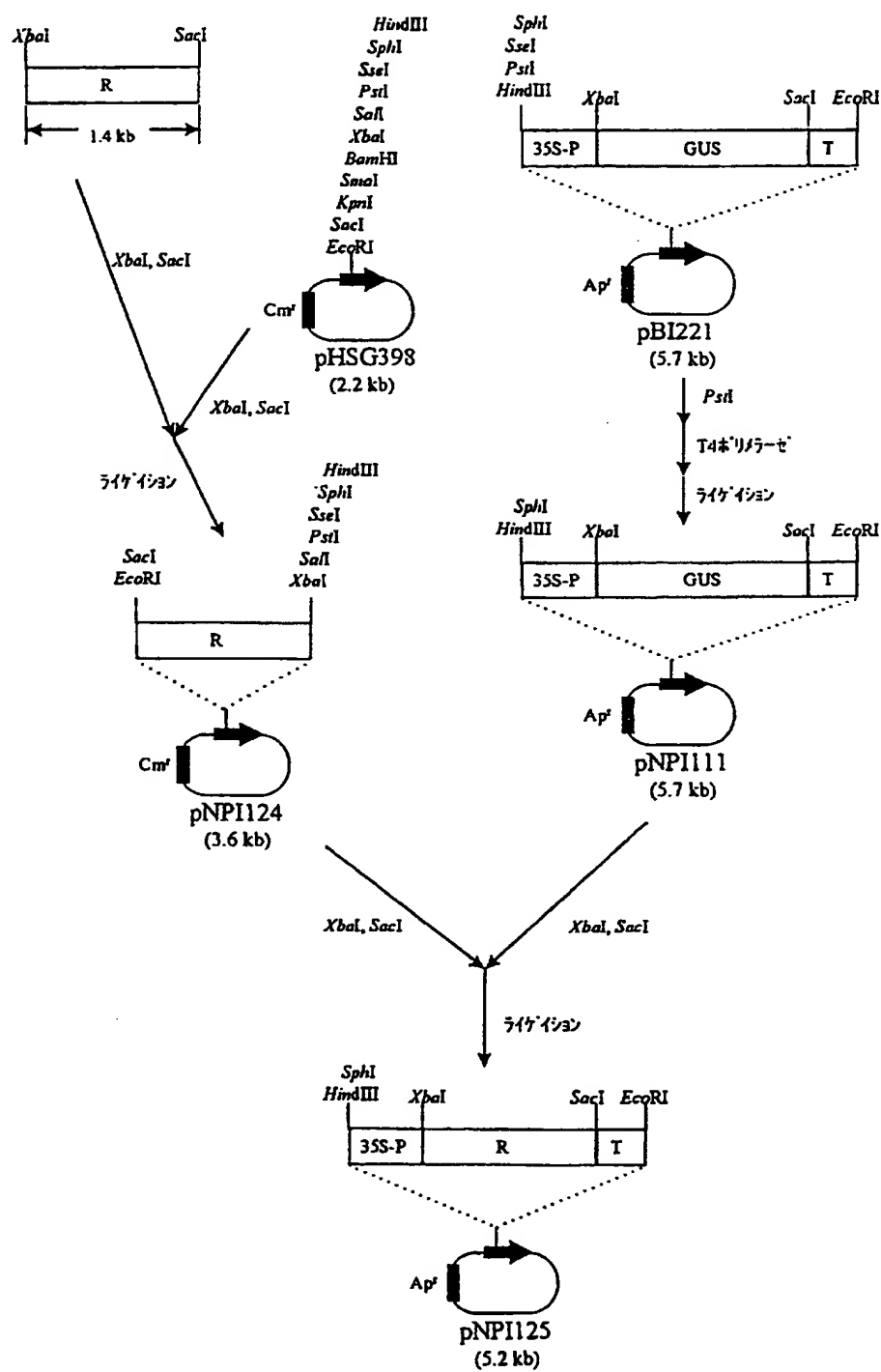


图7

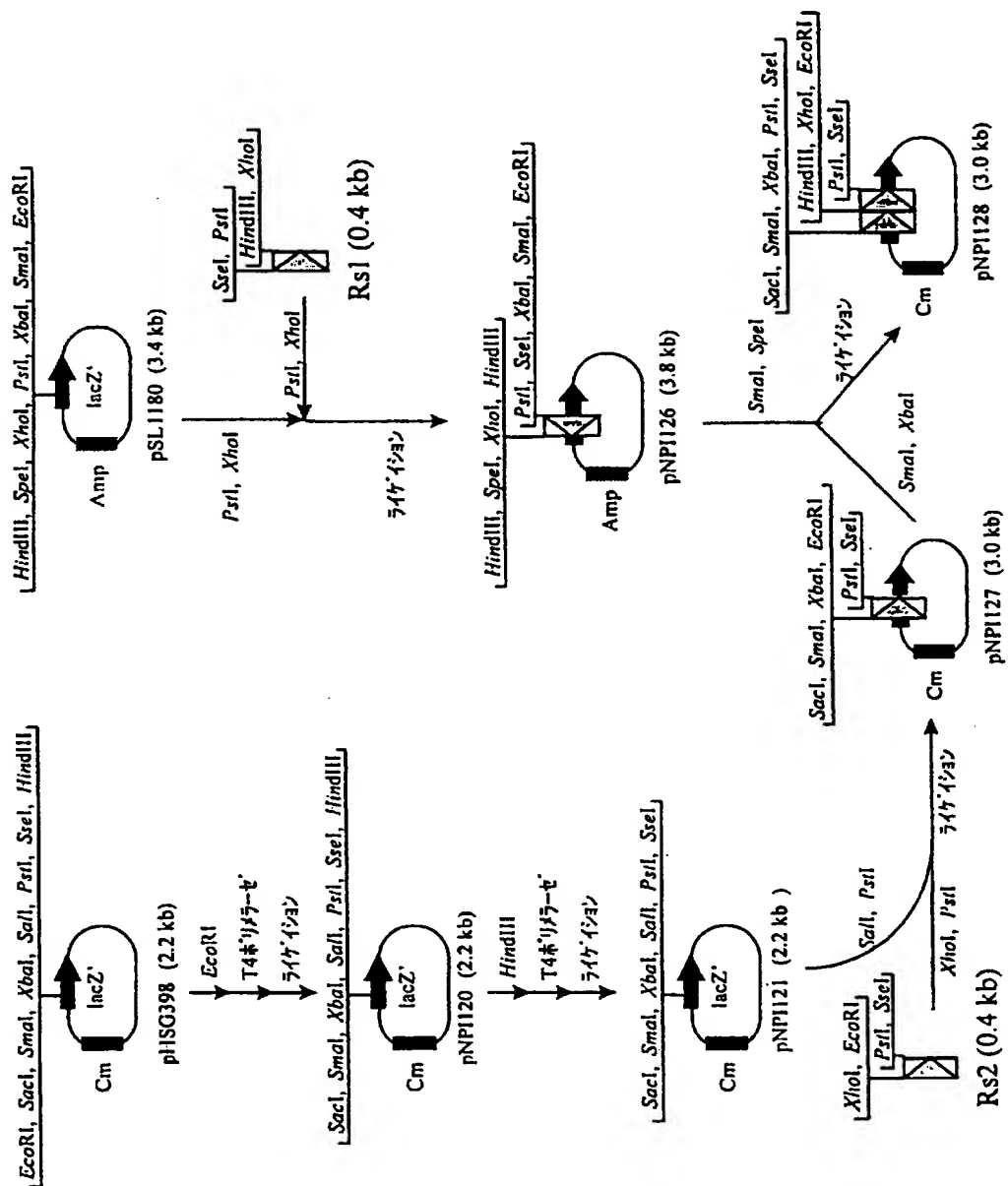


図 8

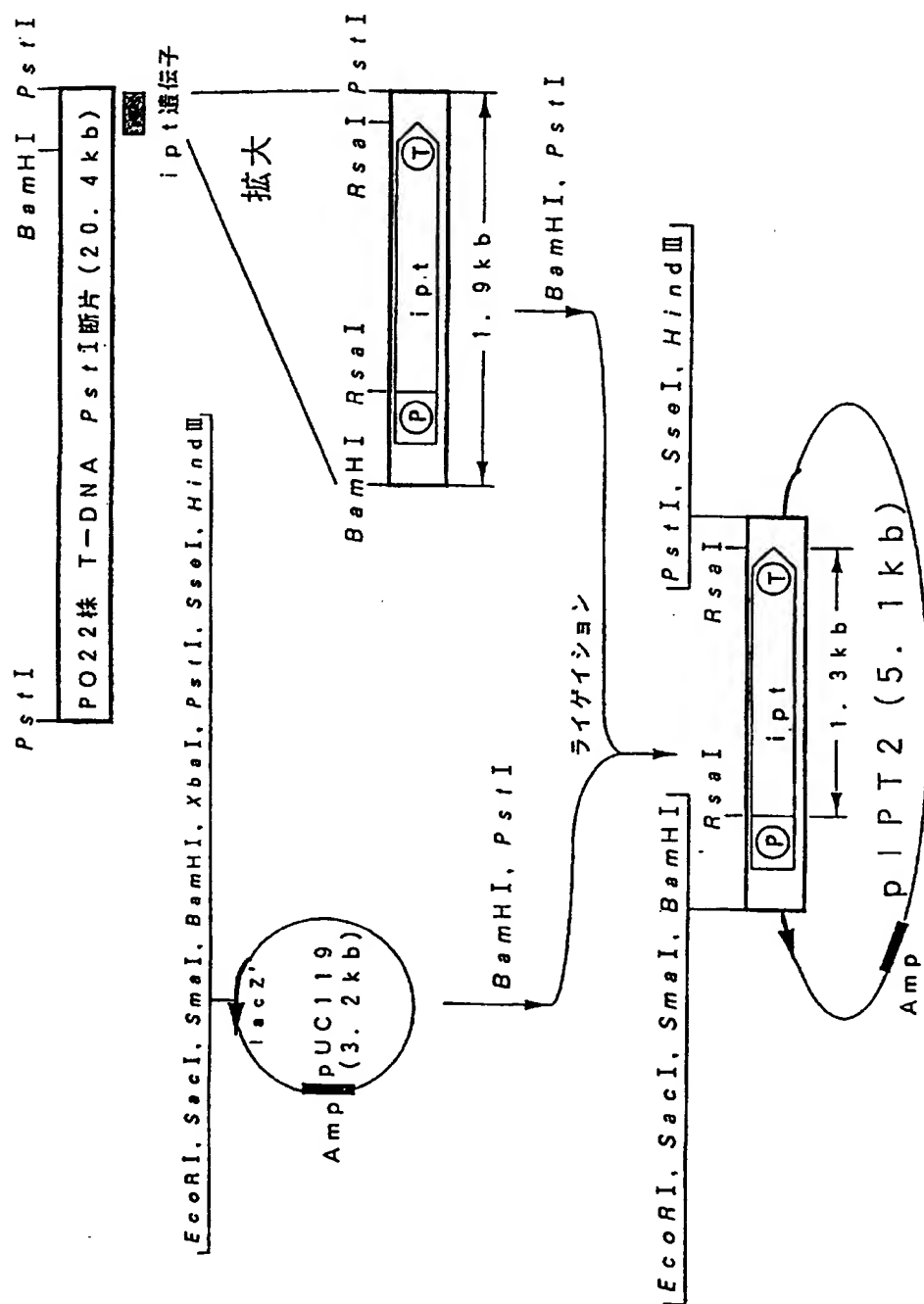


図 9

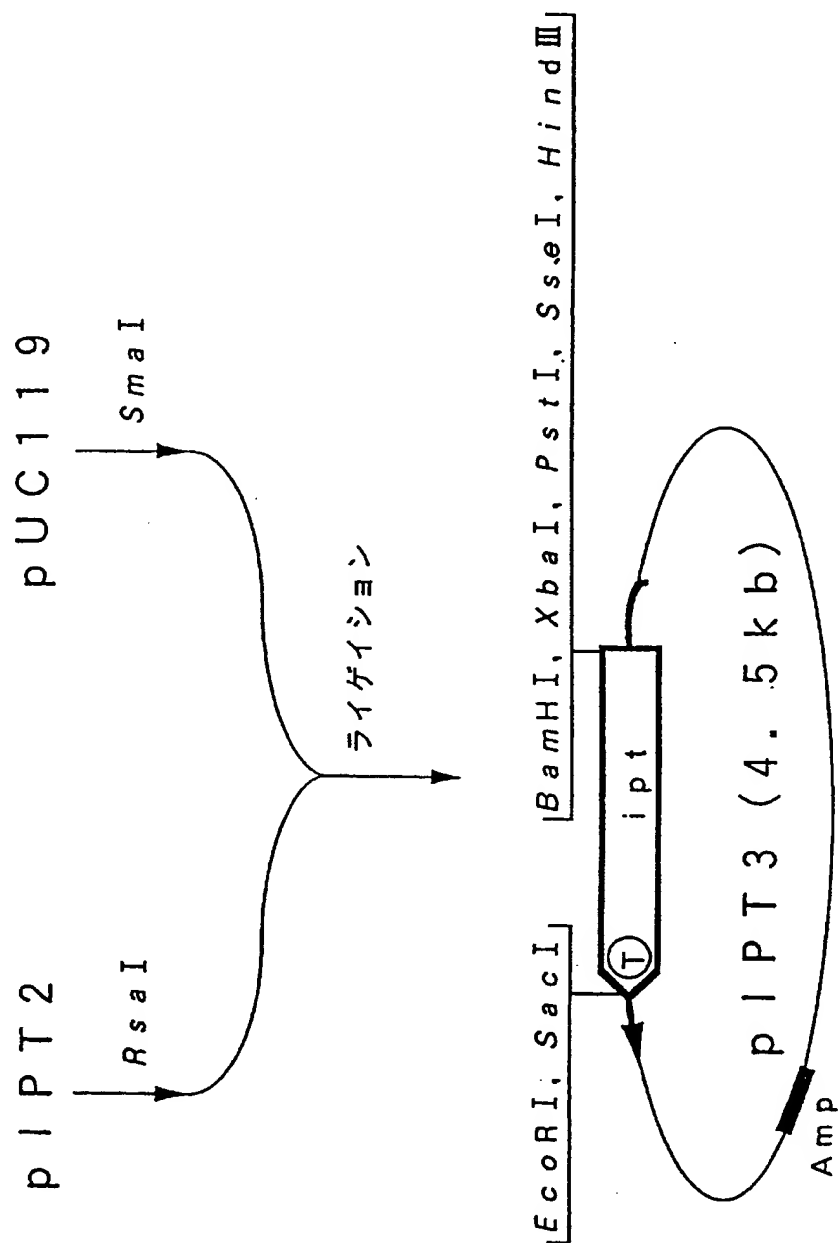
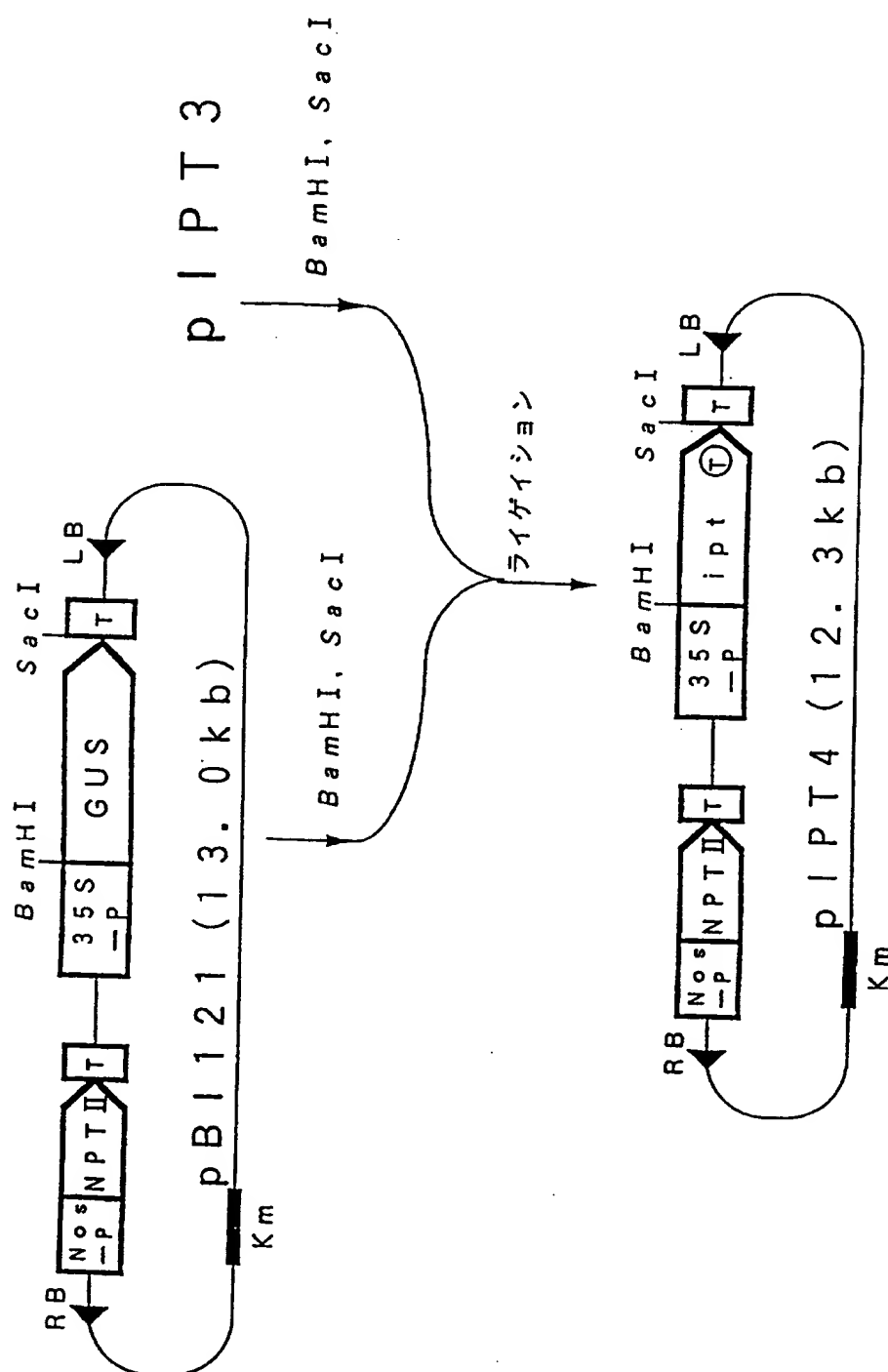


図10



## 図11

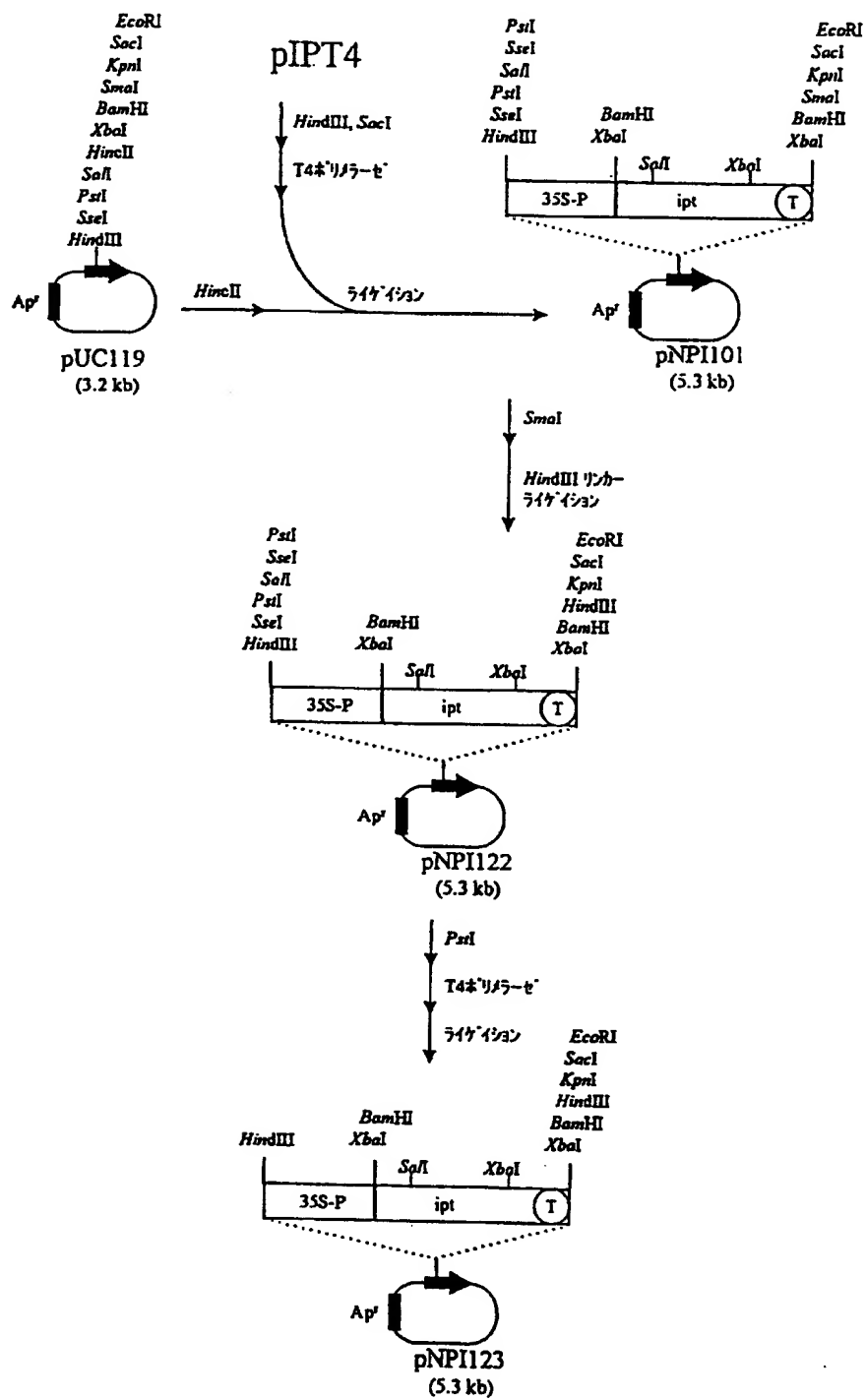


図12

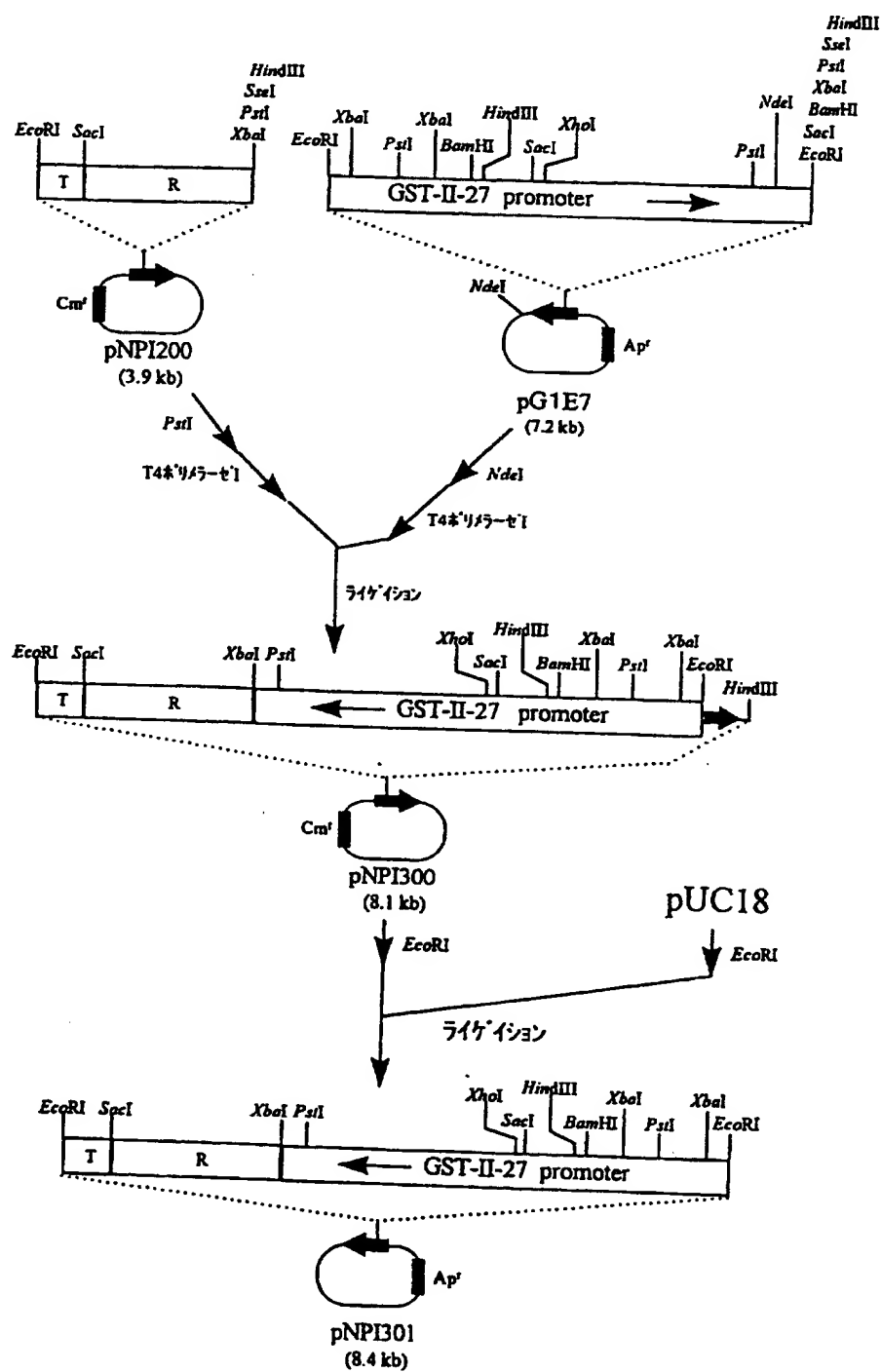


図13

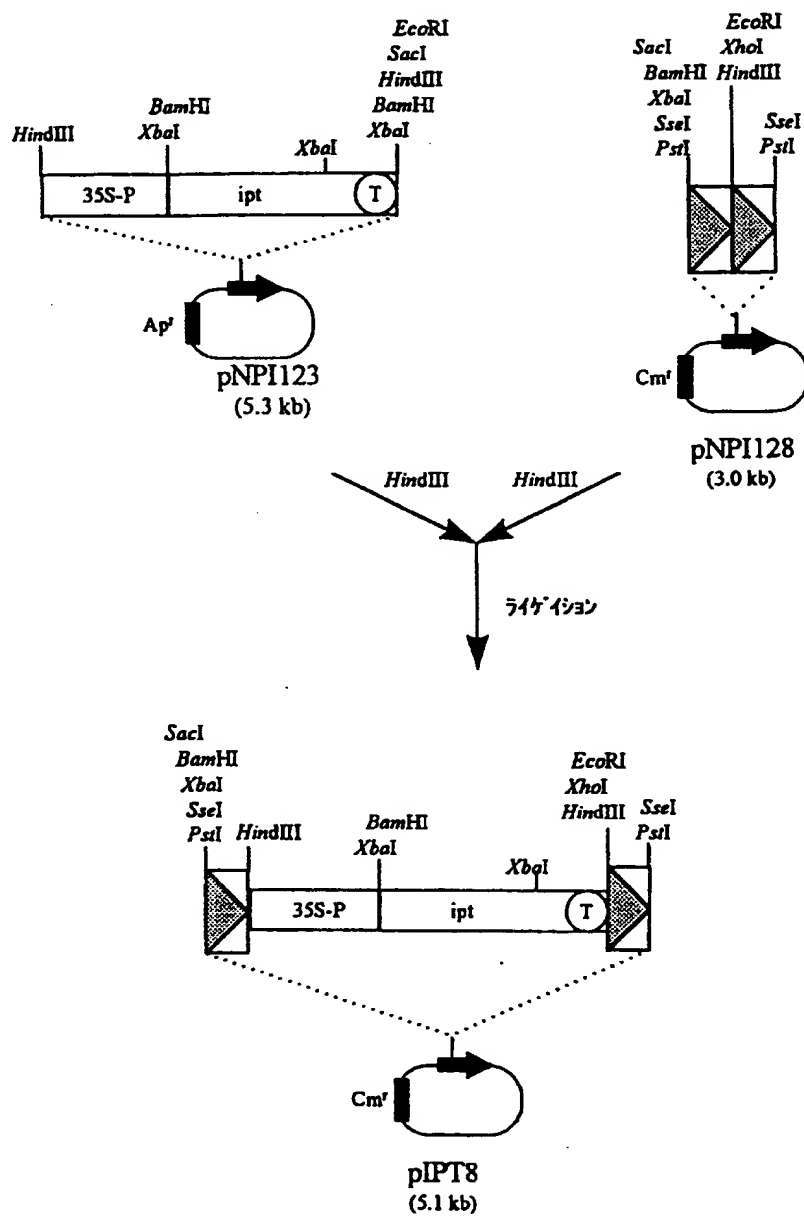




図14

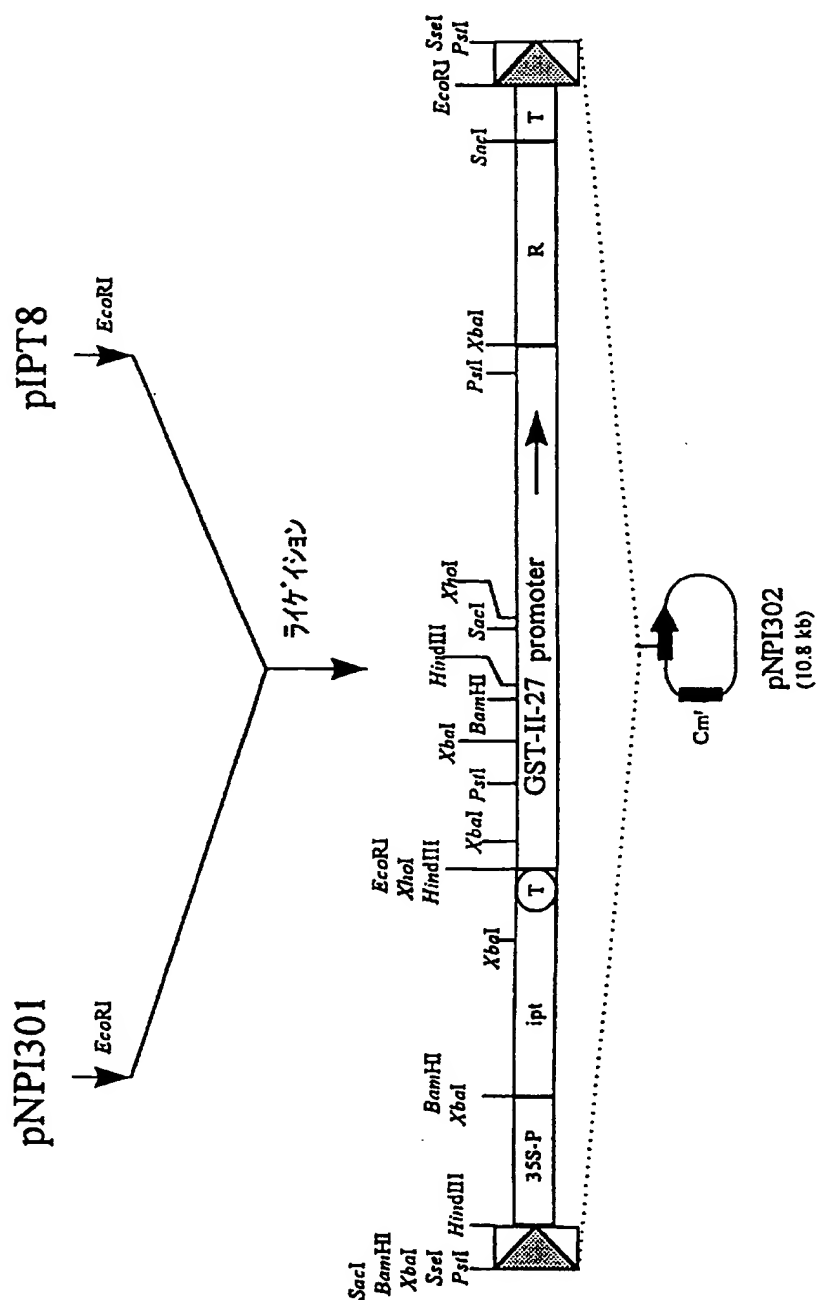
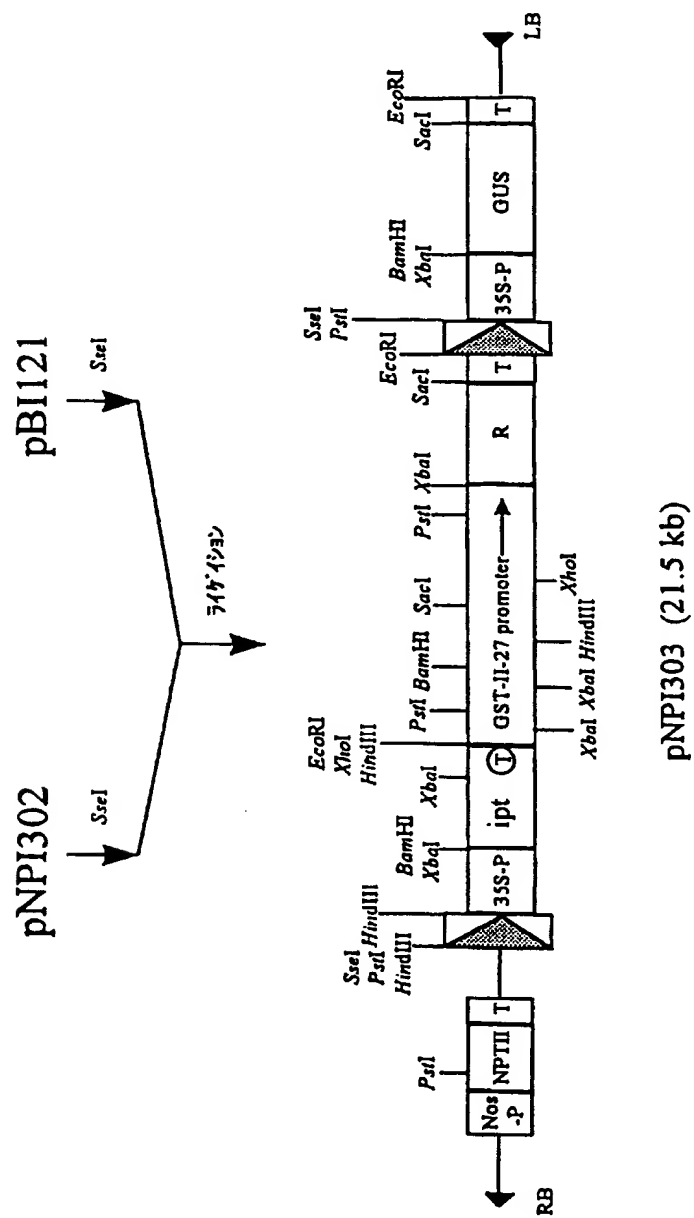


図15



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP97/01569

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. C1<sup>6</sup> C12N15/84

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. C1<sup>6</sup> C12N15/84

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

Biosis Previews, WPI

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO, 93/01283, A1 (The United States of America as Represented by the Secretary of Agriculture), January 21, 1993 (21. 01. 93) & US, 7725320, A & CA, 2073412, A	1 - 9
Y	The Plant Cell, Vol. 1, (1989), A. Spena et al., "Cell-Autonomous behavior of the <u>rolC</u> Gene of <u>Agrobacterium rhizogenes</u> during Leaf Development: A Visual Assay for Transposon Excision in Transgenic Plants", p. 1157-1164	1 - 9

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

## \* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

July 30, 1997 (30. 07. 97)

Date of mailing of the international search report

August 12, 1997 (12. 08. 97)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>8</sup> C12N15/84

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>8</sup> C12N15/84

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

Biosis Previews, WPI

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	W0. 93/01283, A1 (THE UNITED STATES OF AMERICA AS REPRESENTED BY THE SECRETARY OF AGRICULTURE) 21. 1月. 1993 (21. 01. 93) & US, 7725320, A & CA, 2073412, A	1-9
Y	The Plant Cell, Vol. 1, (1989), A. Spina et al., "Cell-Autonomous behavior of the rolC Gene of <i>Agrobacterium rhizogenes</i> during Leaf Development : A Visual Assay for Transposon Excision in Transgenic Plants", p. 1157-1164	1-9

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

30. 07. 97

国際調査報告の発送日

12.08.97

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

植野 浩志

印

4B

9452

電話番号 03-3581-1101 内線 3449